

王桢, 李阳, 车帅, 等. 北极海洋沉积物中可培养细菌及其多样性分析[J]. 海洋学报, 2014, 36(10): 116—123, doi: 10. 3969/j. issn. 0253-4193. 2014. 10. 012

Wang Zhen, Li Yang, Che Shuai, et al. Diversity analysis of culturable bacteria isolated from marine sediments of Arctic[J]. Acta Oceanologica Sinica(in Chinese), 2014, 36(10): 116—123, doi: 10. 3969/j. issn. 0253-4193. 2014. 10. 012

北极海洋沉积物中可培养细菌及其多样性分析

王桢¹, 李阳¹, 车帅¹, 林学政^{1*}

(1. 国家海洋局 第一海洋研究所 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘要: 利用 Zobell 2216E 培养基和涂布平板法对北极海洋沉积物中可培养细菌进行分离纯化, 并利用 16S rRNA 基因进行分子鉴定与系统发育分析。根据菌落形态学特征, 从 59 个站点的沉积物样品中共分离纯化获得 570 株细菌; 基于 16S rRNA 基因的分子鉴定与系统发育分析表明, 分离到的可培养细菌分别属于细菌域的 4 个门, 5 个纲, 12 个目, 23 个科, 47 个属, 102 个种, 其中 γ -Proteobacteria 占绝大多数; 有 14 株菌株与模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似性小于 97%, 为 6 个潜在的新种。北极海域的海洋沉积物中存在着丰富的微生物种质资源, 为开发新型生物活性物质和特殊功能基因打下了基础。

关键词: 北极; 海洋沉积物; 细菌多样性; 系统发育分析

中图分类号: P722. 1; P727; Q939. 1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2014)10-0116-08

1 引言

极地具有独特的地理、环境及气候特征, 其主要特点是变化极大的光照辐射、季节性的光照时间、常年极低的水温(通常在 $-1.8 \sim -2.0^\circ\text{C}$) 和高盐度环境(海水中的盐度一般为 $34 \sim 35$, 海冰中盐囊和盐通道的盐度可达普通海水的 5 倍), 形成了一个酷寒、强辐射和高盐度的自然环境^[1]。北极地区蕴含着丰富的微生物种质资源, 由于其特殊的地理位置和气候条件, 生存于其中的微生物大多有其特殊的生理生化特性和代谢特征。由于数万年的沉积作用, 深海沉积物成分繁复, 是非常复杂的微生物栖息地。有机质是微生物易利用的物质和能源, 而深海沉积物中有机质含量比海水中的要多 $10^4 \sim 10^5$ 倍; 同时, 深海沉积物也

是巨大的基因遗传变异库^[2]。因此, 本研究对于北极地区深海沉积物中微生物的种质及其多样性研究具有重要的意义。

北极区域的微生物多样性研究主要集中在海水—海冰生态系统中; 此外, 北极海水中的浮游微生物^[3] 和冰川中的微生物多样性研究也有报道^[4], 而对北极区域海底沉积物中微生物的研究则较少, 并且集中在某些特定代谢类型, 例如硫酸盐还原菌等^[5-6]。对北极环境中的微生物进行大范围的分离培养, 并在此基础上进行其微生物多样性分析仅在北极海冰样品中得到了开展^[7]。

相对于北极的广阔水域和特殊气候条件, 已有研究结果并不能全面反映北极海域中的微生物种质资源多样性, 因此还需进一步研究调查。2012 年 7—9

收稿日期: 2014-03-16; 修订日期: 2014-04-08。

基金项目: 南北极环境综合考察与评估专项(CHINARE2012-03-05, CHINARE2013-03-05)。

作者简介: 王桢(1989—), 山东省烟台市人, 主要从事极地微生物学研究。E-mail: 916376659@qq.com

* 通信作者: 林学政, 研究员, 主要从事海洋微生物及其应用学研究。E-mail: linxz@fio.org.cn

月中国第五次北极科学考察对北极海域海洋沉积物进行了大面积调查并采集了样品,本文通过原位涂布培养、分离纯化及分子鉴定与系统发育分析,分离培养并发现了大量新的细菌种质资源。这些资源对于了解北极海域海洋沉积物微生物的多样性、发现新的微生物种质资源、开发利用其特殊的功能基因和生物活性物质具有重要意义。

2 材料和方法

2.1 样品

北极海域海洋沉积物样品为2012年7—9月中国第五次北极科学考察采集,对箱式采样器和重力采样器采取的海洋沉积物样品,用无菌药匙采集后置于无菌封口袋中,于“雪龙”船现场进行可培养细菌的分离纯化并于4℃保存,回实验室后进行进一步的分离纯化培养与鉴定。

北极海域海洋沉积物采集样品主要来自于4个区域:白令海及其邻近海域、北冰洋海域太平洋扇区、北冰洋一大西洋扇及其他海域。白令海及其邻近海域采样区域为白令海和阿留申群岛周边海域在内的北太平洋北极边缘海,包括沿白令海西侧航线、阿姆斯特岛—努尼瓦克岛之间的断面BL,沿白令海峡南部的断面BS,在圣劳伦斯岛和普罗维杰尼亚之间的3个站点及圣劳伦斯岛以东、以南的6个站点构成的断面BM,以及白令海峡以南的BN断面。在本区域内,共对21个站位进行采样,水深从26.2~3 900 m不等,均为表层沉积物样品;除BL04站位采用重力采样器,其他20个站位均采用箱式采样器。北冰洋海域太平洋扇区采样区域为太平洋扇区的白令海峡附近及其以北的楚科奇海,包括R、C、CC和SR共4个断面。在本区域内,共对19个站位进行采样,水深从26.2~109.5 m不等,均为表层沉积物样品;均采用箱式采样器。北极海域大西洋扇区主要包括AT和BB两个断面。在本区域内,共对8个站位进行采样,水深从2 433.6~3 674.3 m不等,均为底层沉积物样品;BB04站位采用多管采样器,其余7个站位采用重力采样器。其他海域主要是对冰岛外海及冰站等11个站位进行采样,水深从491~1 597.4 m不等。

2.2 分离培养基与可培养细菌的分离纯化

海水 Zobell 2216E 培养基:蛋白胨 5 g,酵母粉 1 g,琼脂粉 15 g,过滤原位海水:自来水(体积比为 2:1),1 000 mL。

无菌药匙取适量泥样,接于含 5 mL 无菌海水的

试管中,充分混匀,经适当系列稀释后,取 50 μ L 涂布于 2216E 培养基平板上,于 4℃ 低温培养箱中倒置培养 15 d。根据菌落形态学特征,挑取不同的单菌落进行进一步的分离纯化。

2.3 分子鉴定与系统发育分析

DNA 模板的制备参照文献[8]进行。

16S rRNA 扩增采用 50 μ L 扩增体系(1 μ L 27 F, 1 μ L 1492 R, 25 μ L Master Mix, 23 μ L ddH₂O)反应条件:95℃, 5 min; 95℃, 1 min, 55℃, 30 s, 72℃, 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。采用细菌 16S rRNA 扩增通用引物 27 F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3')进行 PCR 扩增,PCR 产物送至南京金斯瑞生物股份有限公司进行纯化和测序。测序获得的 16S rRNA 基因序列长度为 1 300~1 400 bp,测序结果在 NCBI 进行 BLAST 分析。序列比对采用 BioEdit 的多序列比对排列(Clustalw multiple alignment),系统发育分析采用 Mega 4.0 的邻接法(Neighbor-joining method)。与模式菌株的 16S rRNA 基因相似性比较利用 EzTaxon-e Database 进行(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>)^[9]。

3 结果与分析

3.1 菌株的分离纯化与鉴定

经海水 Zobell 2216E 培养基平板 4℃ 培养 15 d,根据菌落形态学特征从 59 个站位的北极海洋沉积物样品中共分离并获得 16S rRNA 基因有效序列的细菌达 570 株。利用 EzTaxon-e Database(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>)检索与获得的 16S rRNA 基因序列相似性最高的模式菌株,结果发现,绝大多数与数据库中已有的模式菌株 16S rRNA 基因序列相似性达 97% 的可占 98%,其中 99% 以上的可达 74.6%。分子鉴定与系统发育分析表明,分离到的可培养细菌分别属于 4 个门,分别为变形菌门 Proteobacteria、放线菌门 Actinobacteria、厚壁菌门 Firmicutes 和拟杆菌门 Bacteroidetes, 5 个纲;其中 γ -变形菌纲 γ -Proteobacteria 有 409 株,数量最多,占总分离株数的 72%;其次为黄杆菌纲 Flavobacteria,共 66 株,占总分离株数的 12%;属于 α -变形菌纲。 α -Proteobacteria、放线菌纲 Actinobacteria_c 和芽孢杆菌纲 Bacilli 的菌株数分别为 45 株、23 株和 13 株,分别占总分离株数的 8%、4%和 2%(见图 1)。值得指出的是,有 14 株菌株与已有模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似性

小于 97 % , 可能为潜在的新种。

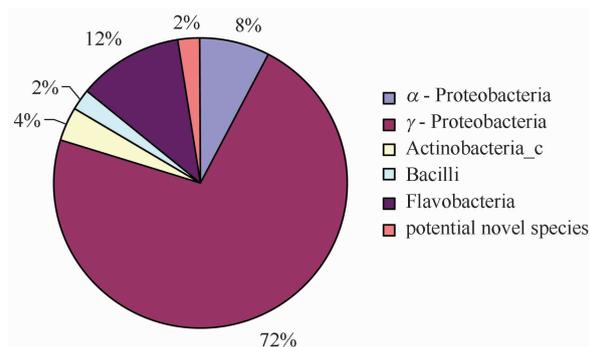


图 1 北极海洋沉积物可培养细菌的组成分析

Fig. 1 Composition analysis of culturable bacteria isolated from Arctic marine sediment

北极海洋沉积物可培养细菌的种属、菌株数量以及分离到该菌株的站位数等基本情况见表 1。可以看出,从 59 个站位中的北极海洋沉积物样品中分离得到的 570 株细菌,分属于 47 个属,102 个种;其中 γ -变形菌纲 γ -Proteobacteria 在细菌属水平上的多样性最为丰富,包括 17 个不同的属,黄杆菌纲 Flavobacteria 次之,包括 11 个属, α -变形菌纲 α -Proteobacteria 含有 7 个属,放线菌纲 Actinobacteria_c 和芽孢杆菌纲 Bacilli 各含 6 个属。在菌株数量上,以希瓦氏菌属 *Shewanella* 所含数量最多,共有 153 株,分属于 8 个种,占总分离菌株数的 27%;且其分布也较广,共从 42 个站位的沉积物样品中分离到该属的菌株。其次为假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* 的菌株,共有 70 株,分属于 10 个种,占总菌株数的 12%;其分布也较广,从 23 个站位的沉积物样品中分离到该属菌株。亚硫酸盐杆菌属 *Sulfitobacter* 和科尔韦氏菌属 *Colwellia* 菌株的出现频率及多样性也比较高,分别包括 5 个种 36 株和 5 个种 25 株。另外,尽管有的属内菌株数量不多,如鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、副球菌属 *Paracoccus* 等仅含一株菌,但可反映出该海域沉积物中微生物的多样性。

表 1 北极海洋沉积物可培养细菌的分离鉴定情况一览表

Tab. 1 Schedule of bacterial isolation and identification from Arctic marine sediment

纲	属	种/菌株数量	出现站位数/频率/%
α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	1/1	1/1.7
	<i>Sphingopyxis</i>	1/2	2/3.4
	<i>Sulfitobacter</i>	5/36	9/15.3

续表 1

纲	属	种/菌株数量	出现站位数/频率/%
γ -Proteobacteria	<i>Albirhodobacter</i>	1/1	1/1.7
	<i>Paracoccus</i>	1/1	1/1.7
	<i>Loktanella</i>	1/2	1/1.7
	<i>Pacificibacter</i>	1/2	1/1.7
	<i>Acinetobacter</i>	2/7	5/8.5
	<i>Psychrobacter</i>	4/17	10/16.9
	<i>Colwellia</i>	5/25	15/25.4
	<i>Glaciecola</i>	4/6	5/8.5
	<i>Marinobacter</i>	2/18	9/15.3
	<i>Moritella</i>	3/19	9/15.3
	<i>Pseudoalteromonas</i>	10/70	23/39.0
	<i>Pseudomonas</i>	6/15	10/16.9
	<i>Psychromonas</i>	4/19	18/30.5
	<i>Shewanella</i>	8/153	42/71.2
	<i>Hafnia</i>	1/1	1/1.7
	<i>Amphritea</i>	1/1	1/1.7
	Actinobacteria c	<i>Marinomonas</i>	1/15
<i>Neptunomonas</i>		1/3	1/1.7
<i>Halomonas</i>		4/17	7/11.9
<i>Salinicola</i>		1/1	1/1.7
<i>Photobacterium</i>		2/22	14/23.7
<i>Brachybacterium</i>		1/2	1/1.7
<i>Janibacter</i>		1/2	1/1.7
<i>Citricoccus</i>		1/1	1/1.7
<i>Arthrobacter</i>		1/1	1/1.7
<i>Kocuria</i>		1/4	2/3.4
Bacilli	<i>Salinibacterium</i>	1/13	4/6.8
	<i>Aerococcus</i>	1/1	1/1.7
	<i>Bacillus</i>	2/5	3/5.1
	<i>Halobacillus</i>	1/1	1/1.7
	<i>Oceanobacillus</i>	1/1	1/0.2
	<i>Sinobaca</i>	1/1	1/0.2
Flavobacteria	<i>Planococcus</i>	2/4	4/6.8
	<i>Arenibacter</i>	1/1	1/1.7
	<i>Bizionia</i>	1/1	1/1.7
	<i>Flavobacterium</i>	3/16	5/8.5
	<i>Joostella</i>	2/4	2/3.4
	<i>Lacinutrix</i>	2/10	4/6.8
	<i>Leeuwenhoekella</i>	1/4	2/3.4
	<i>Maribacter</i>	3/17	17/28.8
	<i>Polaribacter</i>	2/4	1/1.7
	<i>Psychroserpens</i>	1/2	2/3.4
	<i>Sediminicola</i>	1/4	3/5.1
	<i>Winogradskyella</i>	1/3	1/1.7

一般认为, 16S rRNA 基因序列同源性小于 97%, 可以认为属于不同的种; 同源性小于 93%~95%, 可以认为属于不同的属^[10]。经测序与对比分析, 本文发现有 14 个菌株序列与相似性最高的模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似性小于 97%, 并对这

14 株菌株进行系统发育分析(图 2)发现, 可能有 6 株菌为潜在新种。其中有部分菌株, 如菌株 731 与相似性最高的模式菌株 *Amphritea japonica* JAMM 1866^T 的 16S rRNA 基因序列相似性仅有 91.67%, 可能为新属(表 2)。

表 2 疑似新种 16S rDNA 序列相似性比较结果

Tab. 2 Similarity comparison of the 16S rDNA sequences of potential novel species

分离站位	站位经纬度	菌株编号	相似性最高模式菌株 (注册号)	相似度/%
BN05	64°30.733'N, 169°23.879'W	124	<i>Olleya aquimaris</i> L-4 ^T (FJ886713)	96.67
BN08	64°36.464'N, 167°27.569'W	5	<i>Thalassomonas haliotis</i> A5K-61 ^T (NR 041662)	96.13
		222	<i>Winogradskyella ulvae</i> KMM 6390 ^T (HQ456127)	96.84
		224	<i>Winogradskyella ulvae</i> KMM 6390 ^T (HQ456127)	96.88
BB02	72°8.827'N, 8°21.629'E	435	<i>Colwellia asteriadis</i> KMD 002 ^T (EU599214)	95.95
		441	<i>Colwellia asteriadis</i> KMD 002 ^T (EU599214)	95.96
SR05	68°36.906'N, 168°54.599'W	535	<i>Winogradskyella ulvae</i> KMM 6390 ^T (HQ456127)	96.87
BM05	62°48.296'N, 170°54.797'W	649	<i>Bizionia echini</i> KMM 6177 ^T (FJ716799)	95.96
		652	<i>Bizionia echini</i> KMM 6177 ^T (FJ716799)	95.71
		659-2	<i>Bizionia echini</i> KMM 6177 ^T (FJ716799)	95.85
		659	<i>Bizionia echini</i> KMM 6177 ^T (FJ716799)	95.75
OS-2	49°22.654'N, 152°7.933'E	729	<i>Amphritea japonica</i> JAMM 1866 ^T (NR 041616)	91.94
		730	<i>Amphritea japonica</i> JAMM 1866 ^T (NR 041616)	91.86
		731	<i>Amphritea japonica</i> JAMM 1866 ^T (NR 041616)	91.67

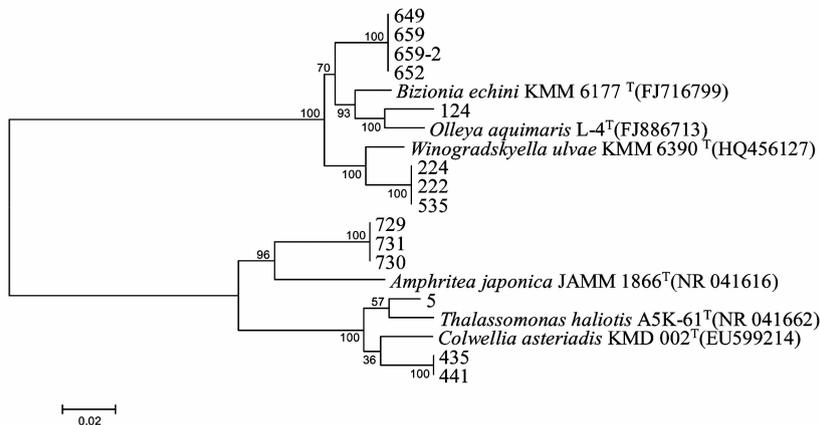


图 2 北极海洋沉积物中可培养细菌中疑似新种的系统发育树

Fig. 2 Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships of potential novel species sequences obtained from culturable bacteria isolated from Arctic marine sediment

3.2 可培养细菌的系统发育分析

通过基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析发现, 所有可培养菌聚类于 5 个大的类群, 102 个种(见图 3 和图 4), 其中, γ -Proteobacteria 纲含有 59 个

种, 占据了细菌多样性的主要地位, 达到了 58% (59/102); 其次是 Flavobacteria 纲细菌, 达到了 18% (18/102); 11 个序列为 α -proteobacteria, 占 11%; 8 个序列为 Bacilli, 占 8%; 6 个序列为 Actinobacteria_c, 占

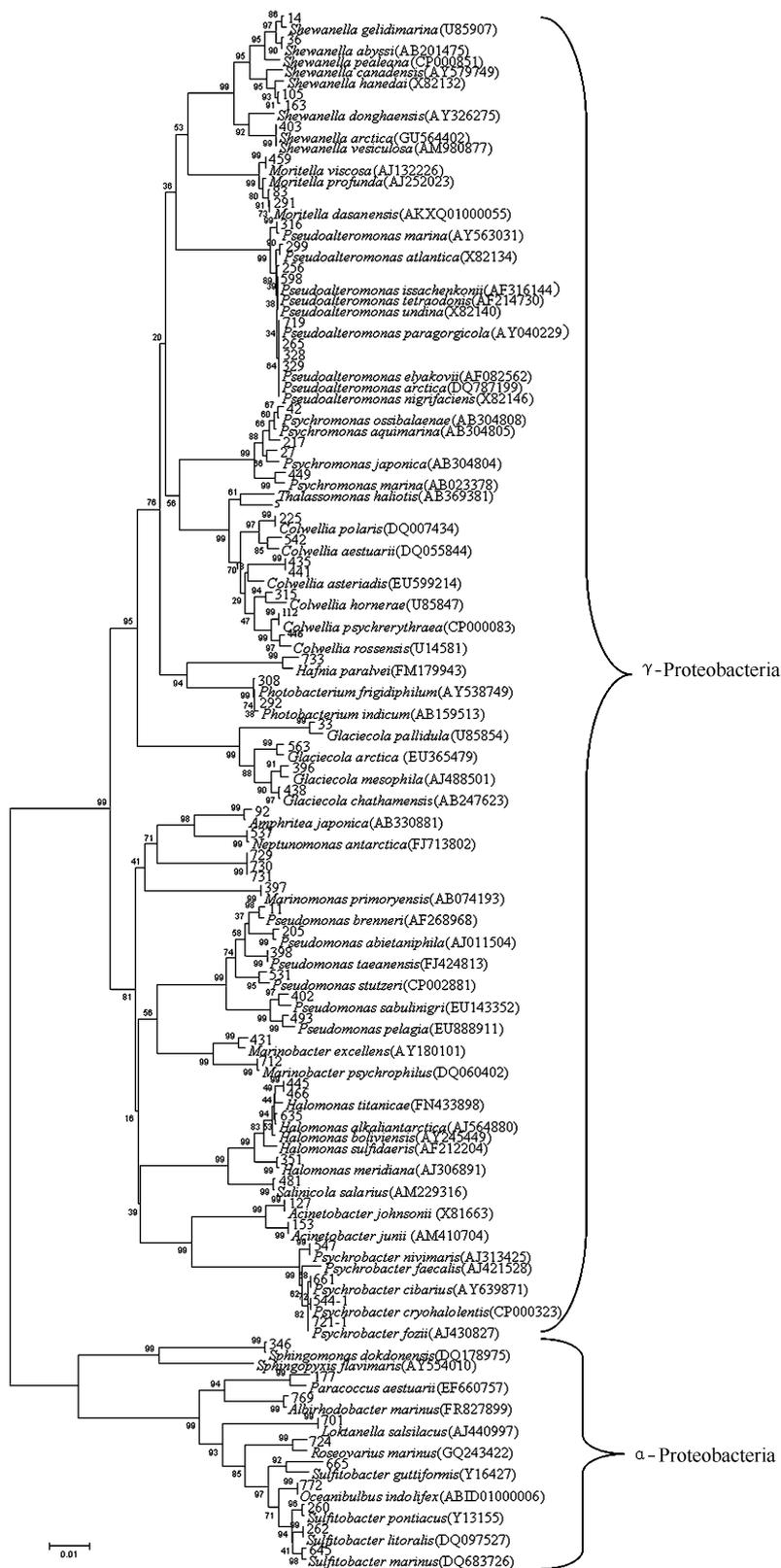


图 3 北极海洋沉积物中可培养细菌中变形菌门的系统发育树

Fig. 3 Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships of proteobacteria sequences obtained from culturable bacteria isolated from Arctic marine sediment

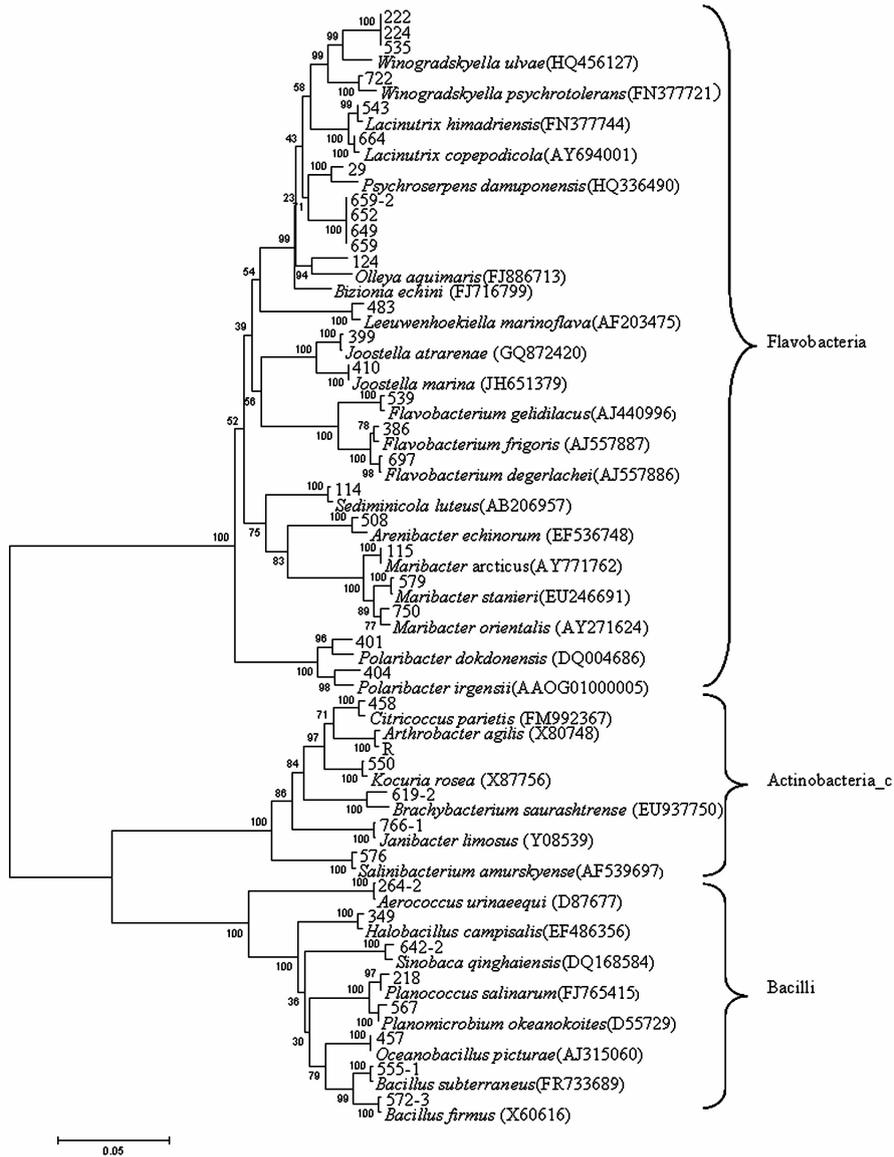


图4 北极海洋沉积物中可培养细菌中黄杆菌纲、放线菌纲、芽孢杆菌纲的系统发育树

Fig. 4 Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships of Flavobacteria sequences, Actinobacteria_c sequences and Bacilli sequences obtained from culturable bacteria isolated from Arctic marine sediment

6%。许多可能的新种(16S rRNA 序列相似性小于 97%)分散于进化树的多个不同分枝,反映了北极菌种资源的丰富性和新颖性。

在 γ -Proteobacteria 纲中发现多个疑似新种,如菌株 435 和 441 菌株与相似性最高的模式菌 *Collwellia asteriadis* KMD 002^T 的 16S rRNA 相似性仅约有 95.95%和 95.96%;菌株 729、730 和 731 与相似性最高的模式菌 *Amphritea japonica* JAMM 1866^T 16S rRNA 相似性只有 91.94%,91.86%和 91.67%;菌株 5 与相似性的模式菌 *Thalassomonas haliotis* A5K-61^T 的 16S rRNA 相似性只有 96.13%。

Flavobacteria 纲中也含有疑似新种,菌株 222、224 和 535 与最近的模式菌 *Winogradskyella ulvae* KMM 6390^T 相似性只有 96.84%、96.88%和 96.87%。菌株 649、652、659 和 659-2 与最近的模式菌 *Bizionia echini* KMM 6177^T 相似性只有 95.96%、95.71%、95.75%和 95.85%,菌株 124 与最近的模式菌 *Olleya aquimaris* L-4^T 相似性只有 96.67%。

4 讨论

为获得北极海域海洋沉积物中新的细菌种质资源,了解其多样性特征,本研究对来自北极海域的 59

个站位的海洋沉积物样品中的可培养细菌进行了分离纯化,获得了大量新的极地微生物种质资源。在测定的 570 株细菌中,变形菌门 Proteobacteria 占可培养细菌的绝大多数,其中以 γ -Proteobacteria 的可培养细菌数量最多,占总分离菌株数的 75%,多样性也最为丰富,占细菌种类多样性的 58%。这与国内外相关研究结果相一致,如林曦等^[11]发现北极白令海深海沉积物中微生物的主要类群为 γ -Proteobacteria,在 γ -变形菌中主要的菌属为假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas*,假单胞菌属 *Pseudomonas* 和希瓦氏菌属 *Shewanella*。Srinivas 等^[12]对北极孔斯峡湾和斯瓦尔巴特群岛的苔原地区的海底沉积物中可培养细菌的多样性进行了研究,结果显示该区细菌分属于四大类,其中 γ -Proteobacteria 是该区的优势种。而 Groudieva 等^[13]在对北极海冰可培养微生物多样性的研究中,也发现 γ -Proteobacteria 纲的细菌数量最多,可占总分离菌数的 70%。

本研究获得的 γ -Proteobacteria 细菌中,属于希瓦氏菌属的细菌最多,其次为假交替单胞菌属,假单胞菌属的数量也较为丰富。假单胞菌自然界分布极广,在自然界物质转化中作用广泛且重要,能利用多种有机物,包括一些较复杂的不易被其他微生物利用的有机物^[14];近来在南极土壤乃至深海沉积物中也有发现,并且与多环芳烃降解有关,或直接参与了降解过程^[15-16]。希瓦氏菌属是典型的深海细菌类群之一,该菌属中绝大多数为嗜冷或耐冷的细菌^[17]。本次实验还分离到芽孢杆菌纲 Bacillus 的细菌,该细菌

一般为好氧异养细菌,它们的出现表明该环境中有机质比较丰富^[18]。

近年来对环境样品中的微生物调查研究大多采用分子生物学技术,这种方法能够获取较为全面的微生物信息,而传统的人工培养方法因为受到培养基成分和培养条件等限制而较少应用。但是培养获得的微生物往往是环境微生物群落中能够反映生态环境特征类群,可以更好地了解样品中处于活体状态的优势细菌类群,评估微生物与环境的关系^[19];同时对培养获得的细菌进行生理生化及酶学研究等,可以为开发利用微生物资源打下基础^[20]。

放线菌与人类关系密切,目前广泛应用的抗生素约 70% 是各种放线菌所产生。一些特殊的放线菌还能产生各种酶制剂、维生素和有机酸等。本实验分离获得 45 株放线菌纲菌株,占总分离菌株的 4%。经过多年的研究,陆地放线菌的研究已经相当深入,现今逐渐转向了海洋放线菌的开发利用。北极地区地理位置、气候条件等的特异性,可能使得处于其中的放线菌也具有特殊的生理生化特性,因此对于北极地区放线菌次级代谢产物的研究具有重大的理论意义和应用价值。

北极独特的生态环境蕴藏着丰富的细菌种质资源。本研究通过优化培养基、改变培养条件将获得更多的可培养菌;而通过分子生态分析将对原位微生物多样性获得更全面的了解。北极沉积物中细菌具有极好的多样性和丰富性。本文所获结果将有助于人们深入认识和开发这一特殊海域的微生物资源。

参考文献:

- [1] 林学政, 边际, 何培青. 极地微生物低温适应性的分子机制[J]. 极地研究, 2003, 15(1): 75-82.
- [2] Zeng Y X, Zou Y, Chen B, et al. Phylogenetic diversity of sediment bacteria in the northern Bering Sea[J]. Polar Biology, 2011, 34(6): 907-919.
- [3] Bano N, Hollibaugh J T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(2): 505-518.
- [4] Skidmore M L, Fought J M, Sharp M J. Microbial life beneath a high Arctic glacier[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3214-3220.
- [5] Sahn K, Knoblauch C, Amann R. Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfate-reducing isolates in marine Arctic sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 3976-3981.
- [6] Knoblauch C, Jorgensen B B, Harder J. Community size and metabolic rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in Arctic marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 4230-4233.
- [7] Junge K, Imhoff F, Staley T, et al. Phylogenetic diversity of numerically important Arctic sea-ice bacteria cultured at subzero temperature[J]. Microbial Ecology, 2002, 43(3): 315-328.
- [8] 林学政, 陈靠山, 何培青, 等. 种植盐地碱蓬改良滨海盐渍土对土壤微生物区系的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(3): 801-807.
- [9] Kim O S, Cho Y J, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 3): 716-721.
- [10] 李贺, 林学政, 何培青, 等. 南极抗细菌活性菌株的筛选及系统发育分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 264-269.

- [11] 林曦, 杨祥胜, 曾润颖. 北极深海沉积物中嗜冷细菌的系统发育分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(3): 411—417.
- [12] Srinivas T N R, Nageswara Rao S S S, Vishnu V R P, et al. Bacterial diversity and Bioprospecting for cold-active lipases, amylases and proteases, from Culturable bacteria of Kongsfjorden and Ny—Ålesund, Svalbard, Arctic[J]. Current Microbiology, 2009, 59(5): 537—547.
- [13] Groudieva T, Kambourova M, Yusef H, et al. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen[J]. Extremophiles, 2004, 8(6): 475—488.
- [14] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th Edition)[M]. USA: The Williams & Wilkins Company, 1994: 335—346.
- [15] Ma YF, Wang L, Shao Z Z. Pseudomonas, the dominant poly-cyclic aromatic hydrocarbon—degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(3): 455—465.
- [16] Cui Z S, Lai Q L, Dong C M, et al. Biodiversity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Deep Sea Sediments of the Middle Atlantic Ridge[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(8): 2138—2149.
- [17] Kato C, Nogi Y. Correlation between phylogenetic structure and function: examples from deep-sea *Shewanella*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35(3): 223—230.
- [18] 孙风芹, 汪保江, 李光玉, 等. 南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1578—1587.
- [19] Sait M, Hugenholtz P, Janssen P H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation independent studies[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(11): 654—666.
- [20] 王鹏, 王风平. 南极阿德雷岛淡水湖沉积物细菌群落研究[J]. 极地研究, 2009, 21(2): 100—107.

Diversity analysis of culturable bacteria isolated from marine sediments of Arctic

Wang Zhen¹, Li Yang¹, Che Shuai¹, Lin Xuezheng¹

(1. Key Lab of Marine Bioactive Substances State Oceanic Administration, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: Culturable bacteria were isolated by use of marine Zobell 2216E medium and spread plate method. Molecular identification and phylogenetic analysis were carried out on the basis of 16S rRNA gene. According to the distinct morphological character of bacterial colony on the marine Zobell 2216E medium plate, a total of 570 isolates were obtained from Arctic sediments. Molecular identification and phylogenetic analysis showed that these isolates belonged to four phylum of the bacteria domain, 5 classes, 47 genera, and 102 species in total. 14 isolates had 16S rRNA gene similarity less than 97% with the closest type strain were grouped into 6 clusters. It indicated that these isolates might be potential novel species. A high diversity of culturable bacteria were isolated from marine sediment of Arctic in term of both species number and phylogenetic composition, which deserves further study and exploitation, such as novel bioactive substances and functional genes.

Key words: Arctic; marine sediment; bacterial diversity; phylogenetic analysis